대한뇌졸중학회지 제4권 제1호 2002년 5월
VOLUME 4, NUMBER 1, MAY, 2002

원 저

실험적 국소 뇌허혈에서 독시싸이클린의 효과

연세대학교 의과대학 신경과학교실

이경열 · 김은희 · 김서현 · 허지회

The Effect of Doxycycline in Experimental Focal Cerebral Ischemia

Department of Neurology, Yonsei University College of Medicine

Kyung Yul Lee, MD; Eun Hee Kim, BS; Seo Hyun Kim, MD; Ji Hoe Heo, MD, PhD

Background : Doxycycline, one of the tetracycline analogs, can inhibit matrix metalloproteinases as well as the leukocyte function, release of oxygen radicals from neutrophils, and inducible nitric oxide synthase, which are involved in tissue damage following cerebral ischemia. It has been reported that tetracycline analogs are effective in patients with rheumatoid arthritis and aortic aneurysm. Considering this previous evidence, doxycycline may have beneficial effects on ischemic stroke. **Methods** : Adult male spontaneous hypertensive rats were anesthetized with isoflurane and subjected to 2 hour middle cerebral artery(MCA) occlusion by retrograde insertion of a nylon suture through the internal carotid artery. Animals received either intraperitoneal doxycycline(45 mg/kg)(N = 9) or normal saline(N = 9) one hour before occlusion and followed by every 2 hours twice. After three hours of reperfusion, animals were decapitated and 2mm-thick coronal slices of the brain were strained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) solution to define the area of ischemia damage. The volume of infarction was measured using the computer-assisted scanner. **Results** : All subjects showed neurologic deficits after MCA occlusion. The infarcted area could be visualized well by TTC staining after three hours of reperfusion. The total infarction volume was significantly reduced in the doxycycline treatment group(12.2±2.58% of whole brain volume) than in the control group(19.5±2.13% of whole brain volume, $p < 0.05$). **Conclusions** : Doxycycline showed a protective effect against ischemic insults in experimental MCA occlusion and reperfusion model of rats.
(Korean Journal of Stroke 2002;4(1): 45~49)

Key Words : Doxycycline, Matrix metalloproteinase, Cerebral ischemia

서 론

급성 뇌경색의 치료에 관한 연구는 크게 막힌 혈관을 가능한 빨리 재관류 시킬 수 있는 혈전용해술과 허혈 상태의 조직에서 세포사를 막거나 늦출 수 있는 신경보호제의 개발로 나누어 볼 수 있다. 급성 뇌경색에서의 세포사의 기전으로는 흥분성 아미노산과 자유유리기가 매개하는 신경세포 손상이 가장 잘 알려져 있다. 최근에는 싸이토카인이나 다형백혈구의 조직내 침투에 의한 이차

책임저자 : 허 지 회
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 신경과학교실
TEL : 82-2-361-5467
FAX : 82-2-393-0705
E-mail : jhheo@yumc.yonsei.ac.kr
*본 연구는 1999년도 보건의료기술 연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(#HMP-99-N-01-0002)

적 염증반응 등이 또 다른 기전으로 제시되고 있다. 이외에도, 단백 분해효소인 matrix metalloproteinase (MMP)에 의한 혈관의 기저막 파괴가 허혈손상에 관여한다고 알려지고 있기도 하다.

MMP는 모든 종류의 세포외 기질을 파괴시킬 수 있는 단백분해 효소로, 현재까지 여러 종류의 MMP가 각기 다른 여러 종류의 세포외 기질을 파괴하는 것으로 알려져 있다[1-3]. 지금까지 신경계 질환과 연관하여서는 다발성 경화증과 뇌종양 등에서 MMP-2 또는 MMP-9가 증가한다고 보고되어 있다[4,5]. 뇌경색에서는 MMP-9에 의한 혈관벽의 기저막 파괴가 뇌경색 후의 출혈전환과 연관되어 있다고 알려졌으며. 또한 MMP-2 또는 MMP-9가 신경손상에 직접 관여할 가능성이 제시된 바 있다[6].

독시싸이클린은 테트라사이클린계의 반합성 약물로서 지용성이며 광범위한 항균효과를 보이는 항생제로 사용되고 있다. 그러나 이러한 항균효과와는 독립적으로 테트라사이클린계의 약물인 독시싸이클린과 미노싸이클린은 MMP의 억제, 악성세포 성장억제, 종양에 의한 혈관혈성 억제, 중성구로부터의 산소 유리기 방출 억제, inducible nitiric oxide synthase의 억제 등의 효과를 보이는 것으로 보고되고 있다[7]. 또한 독시싸이클린과 미노싸이클린이 류마티스 관절염, 대동맥 박리 등의 질환에서 임상적으로 치료효과가 있는 것으로 알려지고 있으며[8,9], 동물실험에서도 여러 장기(뇌, 골격근, 장, 간, 심장 등)의 허혈 및 재관류 손상을 줄이는데 효과가 있다고 보고되었다[7,10-15].

본 연구에서는 일시적 허혈성 뇌경색 및 재관류 동물모델에서 급성기의 독시싸이클린 투여가 뇌경색의 크기 및 신경학적 장애에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 실험적 중뇌동맥 폐색

본 실험에서는 250~320 g의 웅성 자발성 고혈압쥐(spontaneous hypertensive rat)를 사용하였다. 본 연구는 대한의학회가 제정한 동물실험지침에 근거하여 연세대학교 의과대학 실험동물위원회로부터 윤리적 동물실험을 검증받았다. 실험동물은 국소적 뇌허혈 및 재관류시에 복강내로 투여한 독시싸이클린의 효과를 보기 위하여 독시싸이클린 투여군과 생리적 식염수를 투여한 대조군으로 나누었다. 실험군은 2시간 동안 중뇌동맥을 폐색한 후 3시간 동안 재관류 후 희생시켰으며 독시싸이클린은 135 mg/kg의 용량을 생리적 식염수 3 ml에 용해하여 중뇌동맥 폐색 1시간 전부터 2시간 간격으로 3회 분할하여 복강내로 투여하였다. 대조군은 동량의 생리적 식염수만을 투여하였다. 본 연구에서는 총 18마리의 실험동물이 사용되었다. 뇌의 허혈손상은 기존에 보고된 나일론을 이용한 중뇌동맥 폐색과 재관류법을 일부 변형하여 시행하였다[16,17]. 즉, 쥐를 isoflurane 흡입 마취하에서 경부를 정중 절개하여 경동맥을 노출시키고 내경동맥과 외경동맥의 분지들과 외경동맥을 전기소작 또는 결찰하였다. 다음으로 총경동맥을 결찰한 후 내경동맥 기시부에 작은 창을 내고, 이 창을 통해 미리 화염을 이용하여 끝을 둥글게 한 뒤 poly-L-lysine으로 처리된 4-0 나일론 사(Ethicon, Edinburg, UK)를 넣어 중뇌동맥을 폐색하였다[18]. 수술 기간 동안 지속적으로 직장 체온을 측정하며 자동온도 조절장치(Homeothermic Blanket control Unit, Harvard apparatus Inc., Holliston, MA)로 체온을 일정하게 유지하였다. 중뇌동맥 폐색 후 피부를 봉합하였으며 나일론 사의 끝은 피부 바깥에 위치하도록 하였다. 수술이 끝난 후 실험동물을 마취에서 깨운 다음 신경학적 장애의 유무를 관찰하였다. 재관류는 isoflurane 흡입 마취하에서 피부 밖에 남겨져 있던 나일론 사를 조심스럽게 당겨서 실시하였다.

2. 조직처리

재관류 3시간 후 Urethane을 복강내로 주사하여 마취한 상태에서 peristaltic pump를 이용하여 헤파린이 섞인 차가운 생리식염수를 좌심실을 통해 관류함으로써 실험동물을 희생시켰고 즉시 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 brain matrix를 이용하여 관상면으로 전두부부터 2 mm 두께로 잘라 7개로 절편화하였다. 각각의 절편은 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)에 담가 섭씨 37도에서 30 분간 배양하여 염색하였으며 후에 뇌경색의 크기를 측정할 때 이용하였다.

3. 뇌경색의 크기 측정

TTC 염색을 하면 정상 부위는 붉게 염색되는 반면, 뇌경색이 있는 부위는 염색되지 않아 구별이 된다. 뇌경색의 크기를 구하기 위하여 각각 절편의 앞면을 스캐너를 이용하여 1200 dpi로 스캔하였다. 이후 Scion Image program을 이용하여 전체 절편의 면적 및 뇌경색 부분의 면적을 측정하였다. 뇌경색의 크기는 전체 절편의 면적의 합에 대한 뇌경색의 면적의 합을 백분율로 표시하였다. 뇌경색의 크기 측정은 대상동물의 실험군 여부를 모르는 연구자에 의하여 시행되었다.

4. 신경학적 장애정도 측정

모든 실험군에서 재관류 후 희생시키기 전에 신경학적 장애정도를 측정하였다. 신경학적 장애정도는 4가지의 항목을 각각 측정하여 그 해당하는 값을 합산하여 점수를 산정하였다. 1) Push(4점) : 바닥에 놓고 옆으로 밀 때에 버티는 힘이 감소하거나 쓰러지는 경우, 2) Circling(3점) : 마비가 온 방향으로 도는 경우, 3) Shoulder adduction(2점) : 마비가 온 앞발이 몸쪽

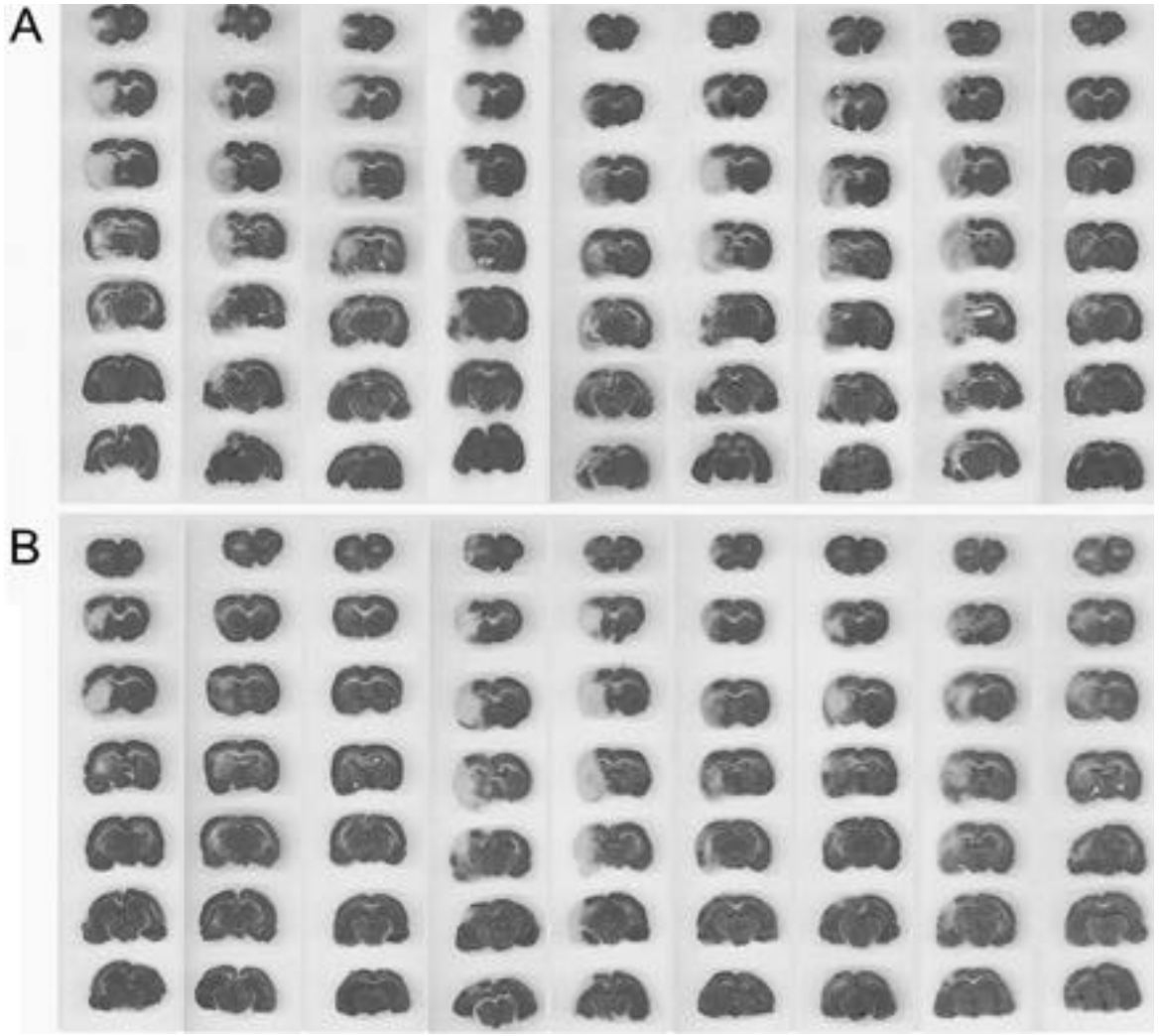

Figure 1. Coronal slices of rat brain with TTC (triphenyltetrazolium chloride) staining. Infarcted area appeared as bright color in this figure. A : control group, B : doxycycline group.

으로 내전되는 경우, 4) Forelimb flexion(1점) : 꼬리를 잡고 거꾸로 들었을 때 마비가 온 앞발이 구부러지거나 책상 모서리를 잡지 못하는 경우.

5. 통계 처리

SPSS 통계 프로그램을 이용하여 통계 처리하였다. 독시싸이클린 투여군과 대조군간의 뇌경색의 크기 및 신경학적 장애 정도의 차이는 비모수검정인 Mann-Whitney test를 사용하였다. 각각의 값들은 평균±표준편차로 표시하였다.

결 과

1. 뇌경색의 크기

독시싸이클린 투여군과 대조군은 각기 9마리였으며, 체중은 각각 286±21.4 g 및 270±23.7 g으로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.14). 독시싸이클린 투여군과 대조군에서 기저핵 및 대뇌피질을 포함한 중뇌동맥 영역에 뇌경색이 유발되었다.(Fig.1). 뇌경색의 크기는 독시싸이클린 투여군에서 12.2±2.58%, 대조군에서 19.5±2.13%로 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 독시싸이클린 투여군에서 대조군에 비해 37.5%의 뇌경색 크기의 감소를 보였다(Fig. 2, $p<0.05$)

2. 신경학적 장애정도

재관류 후 3시간에 측정한 신경학적 장애 정도는 독시싸이클린 투여군과 대조군에서 각각 5.3±1.0 및 6.0±1.7 점으로 독시싸이클린 투여군에서 신경학적 장애가 정도가 적었지만 두군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(p=0.55).

고 찰

이번 연구에서 독시싸이클린의 투여는 일시적인 국소성 뇌경색 및 재관류 동물 모델에서 뇌경색의 크기를 감

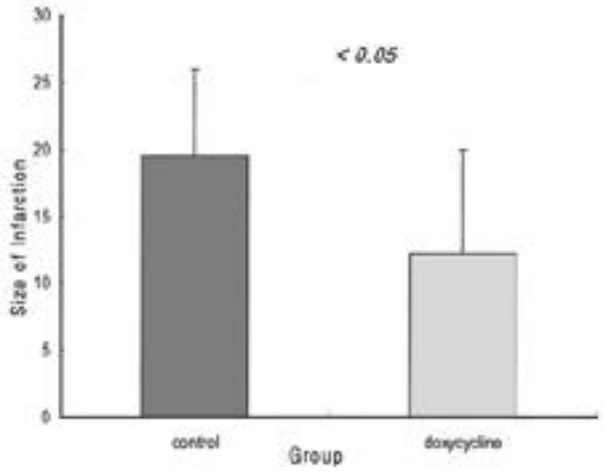

Figure 2. The total infarction volume was significantly reduced by 37.5% in the doxycycline-treated group (12.2±2.58% of whole brain volume) compared to the control group (19.5±2.13% of whole brain volume, $p < 0.05$).

소시키는 치료효과가 있음을 알 수 있었다. 허혈성 뇌경색에서의 독시싸이클린의 치료효과에 대한 기전은 MMP의 억제, microglia 활성의 억제, inducible nitric oxide synthase의 억제, interleukin-1β억제, 염증세포의 침윤 억제 등으로 보고되었다[7,10,13]. 특히 독시싸이클린에 의한 MMP의 억제는 골격근 및 심장의 허혈 및 재관류 손상에서의 치료 효과의 주요한 기전으로 보고되고 있다[11,12]. 이전의 보고들에 의하면 허혈성 뇌경색에서 MMP가 증가되며 이러한 MMP의 증가는 뇌경색 후의 출혈전환, 뇌부종, 신경손상 등에 역할을 하는 것으로 알려져 있다[6,19,20]. 특히, 최근 연구에서는 실험적 뇌허혈에서 MMP 억제제를 투여시 뇌경색 크기가 감소하였다고 하여, 허혈조직내에서의 MMP 증가가 신경손상에 직접 관여할 가능성이 제시되기도 하였다[20,21]. 따라서 독시싸이클린에 의한 MMP의 억제가 이번 실험에서 뇌경색의 크기를 감소시키는 하나의 요인으로 생각된다. 또한 이전의 뇌경색에서의 독시싸이클린의 효과는 재관류를 시행한 후 수일 동안 독시싸이클린을 투여한 결과인데 반하여 이번 실험은 재관류 후 3시간 만에 얻은 결과로서 초급성기에서도 독시싸이클린 투여의 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 저자들이 같은 실험모델을 사용한 이전 연구에서 MMP-9이 혈관 폐색 후 2시간 경과 후인 급성기에도 허혈조직내에 의미있게 증가한다는 결과에 부합한다고 하겠다[21].

이번 연구에서 독시싸이클린 투여군에서 대조군에 비하여 뇌경색의 크기가 뚜렷하게 감소한 반면, 신경학적 장애 정도는 감소는 되었지만 통계적으로는 의의가 없는 정도였다. 이러한 이유는 흰쥐에서 실시할 수 있는 신경학적 검사가 매우 제한되어 있으며 세밀한 부분, 특히 대뇌 피질 기능의 장애를 적절히 측정할 수 없고, 주로 마비 여부만을 평가하게 되어 있기 때문으로 생각된다. 또한, 뇌경색 후에 나타나는 염증반응(면역세포의 침윤, 각종 싸이토카인의 분비 등)들이 유발되기 이전에 실험동물을 희생시킨 것도 다른 가능한 이유일 수 있다. 독시싸이클린의 효과가 단지 MMP의 억제 뿐만 아니라 각종 염증반응을 억제하여서 나타난다는 보고들을 고려할 때 재관류 후 시간이 경과할수록 보다 대조군에 비해 더 뚜렷한 치료효과를 기대할 가능성은 있다.

이번 연구의 한계점으로는 일과성 뇌경색 후 재관류 모델에서 독시싸이클린 투여에 의한 치료효과만을 확인하였을 뿐, 치료효과를 유발한 기전에 대한 연구가 이루어지지 않았다는 점과 함께 앞서 밝힌 바와 같이 초급성기에서의 독시싸이클린의 효과만을 평가하였다는 점이다. 이러한 점을 보완하기 위해서는 재관류 후 급성기부터 만성기까지의 시간적 경과에 따른 독시싸이클린의 치료효과에 대한 연구와 함께 MMP의 측정, 뇌경색 부위의 조직화학적인 검사 및 각종 싸이토카인 측정 등과 같은 치료의 기전을 밝히기 위한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Matrisian LM, Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-125.
2. Nagase H. Activation mechanism of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-160.
3. Baramova E, Foidart J-M. Matrix metalloproteinase family. *Cell Biol Intl* 1995;19:239-242.
4. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, Adams SE, Gearing AJ. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol* 1997;72:155-161.
5. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23:406-415.
6. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:624-633.
7. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15769-15774.
8. O'Dell JR, Blakely KW, Mallek JA, Eckhoff PJ, Leff RD, Wees SJ, Sems KM, Fernandez AM, Palmer WR, Klassen LW, Paulsen GA, Haire CE, Moore GF. Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis: a

two-year, double-blind comparison of minocycline and hydroxychloroquine. *Arthritis Rheum* 2001;44:2235-2241.

9. Mosorin M, Juvonen J, Biancari F, Satta J, Surcel HM, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Vasc Surg* 2001;34:606-610.
10. Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13496-13500.
11. Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A, Cowled PA. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:260-269.
12. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000;101:1833-1839.
13. Clark WM, Lessov N, Lauten JD, Hazel K. Doxycycline treatment reduces ischemic brain damage in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Mol Neurosci* 1997;9:103-108.
14. Smith JR, Gabler WL. Protective effects of doxycycline in mesenteric ischemia and reperfusion. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995;88:303-315.
15. Smith JR, Gabler WL. Doxycycline suppression of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury. *Inflammation* 1994;18:193-201.
16. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84-91.
17. Wang LC, Futrell N, Wang DZ, Chen F-J, Zhai Q-h, Schultz LR. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long-term survival, in aged rats. *Stroke* 1995;26:2087-2090.
18. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke* 1996;27:1616-1622.
19. Lapchak P, Chapman D, Zivin J. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic(tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000;31:3034-3040.
20. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: Inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 1998;29:1020-1030.
21. Lee KY, Yang WS, Kim EH, Heo JH, Kim DG. The temporal changes of matrix metalloproteinases in experimental middle cerebral artery occlusion and reperfusion. *J Korean Neurol Assoc* 2001;19:278-284.